Aus dem Medizinischen Strahleninstitut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. W. Frommhold

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BLEOMYCIN^{R} – WIRKUNG AM DÜNNDARM DER MAUS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GOTTFRIED MÜLLER
aus Sulzbach - Rosenberg

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0064

Aus dem Medizinischen Strahleninstitut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. W. Frommhold

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BLEOMYCIN^{R} – WIRKUNG AM DÜNNDARM DER MAUS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GOTTFRIED MÜLLER
aus Sulzbach - Rosenberg

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. R. Lempp
1. Berichterstatter :	Priv.- Doz. Dr. G. Bürkle
	(Professor Dr. W. Frommhold)
2. Berichterstatter :	Professor Dr. K.W. Peters

Druck: Hans–Joachim Köhler,Reprografischer Betrieb,7400 Tübingen, Neue Straße 11

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Gernot Bürkle, Chefarzt der Radiologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Donaueschingen, danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Grundlagen	3
2.1.	Der Zellzyklus	3
2.2.	Der Zellzyklus und die Methode der markierten Mitose	4
2.3.	Die Zellkinetik im Duodenum	7
3.	Material und Methoden	9
4.	Ergebnisse	11
4.1.	Auswertung der Zählung von jeweils 100 Mitose-Zellen pro Tier	11
4.1.1.	"Markierte Mitose"-Kurve der unbehandelten Tiere	11
4.1.2.	"Markierte Mitose"-Kurve der mit Bleomycin^{R} behandelten Tiere	12
4.2.	Auswertung der Zählung von jeweils 20 Duodenal-krypten	16
4.2.1.	Unbehandelte Tiere	16
4.2.1.1.	Mitoserate	16
4.2.1.2.	DNS-Synthese	16
4.2.1.3.	Morphologie	16
4.2.2.	Mit Bleomycin^{R} therapierte Tiere	17
4.2.2.1.	Mitoserate	17
4.2.2.2.	DNS-Synthese	18
4.2.2.3.	Morphologie	18
4.3.	Auswertung der Zottenmarkierung	21
5.	Besprechung der Ergebnisse	23
5.1.	Zellkinetik nach Bleomycin^{R}-Therapie	23
5.1.1.	Wachstumhemmende Wirkung	23
5.1.2.	Zellzyklusspezifische Wirkung	23
5.1.3.	Phasenspezifische Wirkung	24
5.2.	Veränderungen der DNS-Syntheseleistung und des ^{3}H-TdR-Einbaus nach Bleomycin^{R}-Therapie	25
5.2.1.	In der Literatur erwähnte Veränderungen	25
5.2.2.	Minderung des ^{3}H-TdR-Einbaus	25
5.2.3.	Veränderung des ^{3}H-TdR-Index	26

Seite

5.2.4. Bedingungen für die Interpretation des ^{3}H-TdR-Index 27

5.2.5. Mögliche Beeinflussung des ^{3}H-TdR-Index durch Bleomycin^{R} 27

5.3. Beobachtung über Veränderungen der Zellmorphologie 29

5.3.1. In der Literatur erwähnte Veränderungen 29

5.3.2. Veränderungen bei proliferierenden Zellen 29

5.3.3. Veränderungen bei nicht proliferierenden Zellen 30

5.3.4. Phasenabhängige Veränderungen 30

5.4. Beobachtungen über die Epithelerneuerung im Dünndarm 31

6. Ausblick auf Therapiemöglichkeiten 33

6.1. Voraussetzungen 33

6.2. Bleomycin^{R} und Strahlentherapie 33

6.3. Optimierte Mono-Therapie 34

6.4. Kombinierte Chemotherapie 34

6.5. Zusammenfassende Beurteilung 34

7. Zusammenfassung 36

8. Literaturverzeichnis 37

1.
Einleitung und Problemstellung

Seit Jahren verwendet die Humanmedizin in der Krebstherapie eine Vielzahl antineoplastisch wirksamer Chemotherapeutika. Ihre zum Teil hervorragende zytotoxische Wirkung kann häufig nicht voll genutzt werden, da diese Medikamente auch nicht erkrankte Organe schädigen und damit die für die Tumortherapie an sich notwendig hohe Dosierung begrenzen. Alle bekannten Zytostatika greifen in Stoffwechselvorgänge ein, die sowohl gesunden wie entarteten Zellen eigen sind. Insbesondere Organsysteme mit hoher Neubildungsrate wie das hämopoetische System und der Intestinaltrakt werden deshalb mitgeschädigt. Aus diesem Grund sucht man nach spezifisch tumorwirksamen Medikamenten.

1966 wurde im japanischen Schrifttum eine Substanz vorgestellt, isoliert aus streptomyces verticillus, der antibiotische und antineoplastische Wirksamkeit und darüberhinaus eine gewisse Spezifität für Plattenepithelien zugesprochen wurde (Umezawa et al. 1966; Ichikawa 1969 b). Diese Substanz, genannt Bleomycin^{R}, ist ein Gemisch aus 13 Glycopeptiden; eines davon - die Komponente "A 2" - soll für die antineoplastische Wirkung verantwortlich sein (Umezawa et al. 1970).

Sehr bald nahm man dieses Medikament wegen der ihm zugesprochenen Spezifität in die klinische Erprobung und stellte gewisse Erfolge fest an Hauttumoren (Ichikawa et al. 1967 und 1969 a/b; Takeda et al. 1970; Pfister 1971), in der Urologie (Völter 1971; Shastri et al. 1971), in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (Theissing 1971; Ganzer u. Mitarb. 1971) und in der Gynäkologie (Suzuki et al. 1970; Barlow et al. 1973).

Zu diesen Erfolgen wurden Nebenwirkungen berichtet wie Fieber und Übelkeit, Hautsklerosierung, Nägeldeformationen, Haarausfall und als folgerschwere Veränderungen vor allem interstitielle Lungenfibrosen (Shastri et al. 1971). Ein zytotoxischer Effekt auf das hämopoetische System (Ichikawa

et al. 1968) und das Wechselgewebe des Darmtrakts wurde nicht gesehen (Matsuda et al. 1968; Ishii et al. 1968). Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen, die bei Versuchen an chemisch induzierten Tumoren an Nagern neben Tumorregressionen nach Bleomycin^{R}-Therapie auch eindeutige histologische Veränderungen am Dünndarm erbrachten (Bürkle u. Mitarb. 1972, 1973 a/b/c).

In der vorliegenden Untersuchung sollte versucht werden, über die Art und Weise der Blecmycin^{R}-Wirkung Näheres auszusagen. Die Erörterung sollte

1. am Tierexperiment in vivo erfolgen,
2. an einem überschaubaren Modell durchgeführt werden,
3. einen Zellzyklus proliferierender Zellen verfolgen und
4. aus dem Vergleich der Zellproliferation nach Bleomycin^{R}-Therapie mit dem Zellwachstum unbehandelter Tiere Schlüsse ziehen lassen über die antineoplastische Wirkung des Medikaments,
5. für die klinische Therapie Hinweise zur Anwendung liefern.

Als in vivo Modell wurde der Dünndarm der Maus gewählt : Der Zellzyklus der proliferierenden Kryptenzellen sollte kinetisch mit der histoautoradiographischen Methode der "markierten Mitose" untersucht werden. Die veränderte Kinetik im Zellzyklus nach Blecmycin^{R}-Therapie sollte Hinweise geben für eine eventuell vorhandene, phasenspezifische Wirkung und außerdem eine zellkinetische Erklärung für das Ausmaß der Darmschädigung nach Bleomycin^{R}-Therapie in bereits vorliegenden Untersuchungen (Bürkle u. Mitarb. 1973 a/b).

2.
Grundlagen

2.1.
Der Zellzyklus

Morphologische Veränderungen und biochemische Vorgänge in der proliferierenden Zelle gestatten eine Unterteilung des Zyklus von Mitose zu Mitose in einzelne Phasen : S-("Synthese")-Phase bei Synthese von DNS und G_1- bzw. G_2-("gap")-Phase bei Nichtsynthese von DNS.

Nach einer Zellteilung verweilen proliferierende Zellen in der G_1-Phase. In dieser Ruhephase findet man bei den Zellen keine DNS-Synthese, wohl aber Produktion von RNS und Proteinen. Ein besonders kritischer Punkt scheint am Ende dieser Phase zu sein : Hier ertscheidet sich für die Zelle, ob sie weiter im Kompartiment der proliferierenden Zellen bleibt und erneut in eine Mitose gehen wird, oder ob sie zur differenzierten Zelle bestimmt wird und die Teilungsmöglichkeit verliert. An diesem kritischen Punkt initiiert ein unbekanntes Signal einen raschen Anstieg der RNS-Produktion, und unmittelbar darauf beginnt die DNS-Synthesephase. In dieser sogenannten S-Phase erfolgt der Aufbau der DNS zum diploiden Gensatz der späteren zwei Tochterzellen, daneben verläuft konstant RNS- und Proteinsynthese. Sind die Doppelhelices komplett, endet die S-Phase; man findet keine DNS-Neusynthese mehr, lediglich eine Produktion von RNS und Proteinen und nennt diese neue Stufe des Zyklus die G_2-Phase. Biochemisch endet die G_2-Phase mit der Abnahme der Syntheserate für RNS und Proteine, morphologisch mit dem Beginn der Mitose durch Bildung der Prophase.

Der Zellzyklus umfaßt also vier Phasen, die von der proliferierenden Zelle kontinuierlich durchlaufen werden : G_1 , S , G_2 , M . Daneben unterscheidet man noch potentiell proliferierende Zellen im sogenannten G_0-Stadium, aus dem die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten können.

2.2.
Der Zellzyklus und die Methode der markierten Mitose

Bietet man Zellen, die eine ungestörte DNS-Synthese unterhalten, radioaktiv markierte Vorstufen für die DNS an, so läßt sich diese Syntheseleistung im Histoautoradiogramm sichtbar machen und zusätzlich noch den entsprechenden Zellstrukturen - hier dem Kern - zuordnen. Läßt man Tritium-Methyl-Thymidin (^{3}H-TdR) von den Zellen inkorporieren, indem man es als einmalige Injektion ("Puls") verabreicht - in der Dosis so bemessen, daß dieser DNS-Präkursor wegen seines Abbaus nur kurz für die Zellen verfügbar ist (Koburg u. Mitarb. 1961; Pelc et al. 1965) - so werden alle Zellen, die sich gerade in der S-Phase, der DNS-Synthesephase, befinden, das markierte Thymidin einbauen.

Beobachten wir von diesem Zeitpunkt "Null" an alle auftretenden Mitosen, so müssen nach einer Zeit t_{G2}, die im Zyklus zwischen S-Phasen-Ende und Mitosebeginn liegt, die ersten Mitosen auftreten, die markiertes Thymidin in der DNS aufweisen.

Von da an müssen über eine Zeit t_S hinweg alle sichtbaren Mitosen markiert sein, da alle Zellen, die sich zum Zeitpunkt "Null" gerade in der DNS-Synthesephase befunden haben - gleichgültig ob am Anfang oder Ende dieser Phase - markiertes Thymidin eingebaut haben.

Nach der Summe der Zeiten $t_{G2} + t_S$ kommen gerade diejenigen Zellen in die Mitose, die sich zum Zeitpunkt "Null" kurz vor der DNS-Synthesephase befunden haben und wegen der kurzen Verfügbarkeit von ^{3}H-TdR bei Beginn ihrer S-Phase nur noch endogenes, nicht markiertes Thymin einbauen. Diese Mitosen erscheinen nun erstmals in nicht markierten Zellen und zwar über eine Zeit hinweg, die der Summe der Phasenzeiten $t_{G1} + t_{M(itose)} + t_{G2}$ entspricht.

Da die Summe aus t_{G1}, t_S, t_{G2} und t_M gleich t_G, der Generationszeit oder der Zeit von Mitose zu Mitose ist, treten nach einer Zeit $t_{G2}+t_G$ wieder markierte Zellen in Mitose

auf, wobei es sich um die markierten Tochterzellen derjenigen Zellen handelt, die zum Zeitpunkt t_{G2} erstmals als markierte Mitosen gesehen wurden.

Trägt man die markierten Mitosen in % aller gefundenen Mitosen gegen eine Zeitskala auf, ergibt sich graphisch Abbildung I.

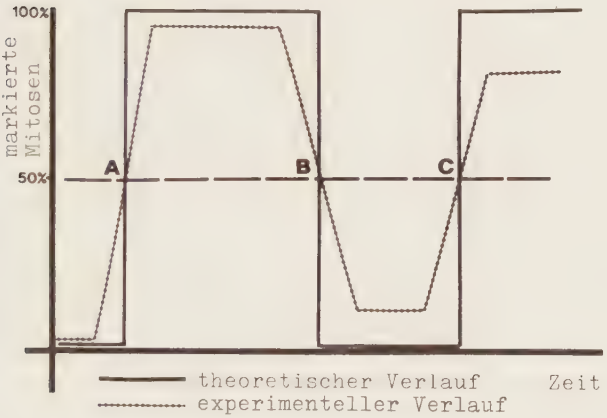

Abb. I : Modell der "markierten Mitose"-Kurve

Der theoretische Verlauf ist ein Modellverlauf, der praktisch im Versuch aus einigen Gründen nicht erreichbar ist : Die Verfügbarkeitsdauer von ^{3}H-TdR ist nicht genügend kurz, da der "Puls" von einer gewissen Dosis bemessen sein muß, um eine ausreichend deutliche Markierung zu erhalten. Diese höhere Dosis wird deshalb erst nach 30 - 40 Minuten soweit abgebaut sein, daß keine weiteren S-Phasen-Zellen mehr markiert werden können (Koburg u. Mitarb. 1961; Pelc 1962; Pelc et al. 1965).

Auch die Zeit zwischen Injektion zum Zeitpunkt "Null" und erster Verfügbarkeit von ^{3}H-TdR für die proliferierenden Zellen spielt hier eine Rolle. Je länger diese ist, um so viel mehr verlängert sich in der Graphik das Null %-Niveau, das Äquivalent für die Dauer von G_2. Zeitlich mag dieser Fehler gering erscheinen, bei kurzen G_2-Phasen schlägt er sich jedoch prozentual stark nieder.

Noch wichtiger als die methodischen Fehlerquellen sind die biologischen : Die proliferierenden Zellen können unterschiedlich lange in den Zyklusphasen stehen. Hier werden - wie häufig in biologischen Systemen - Mittelwerte erfaßt, ohne daß mit dieser Methode die Streuung um diese Mittelwerte vernachlässigt würde. Das Maß der Streuung in unserer Methode ist die Steigung der ansteigenden und abfallenden Schenkel durch A bzw. B (Quastler et al. 1959). Je einheitlicher die Phasenzeiten von den Zellen eingehalten werden, umso steiler verlaufen diese Schenkel. Dabei sind Summationseffekte zu berücksichtigen : Der abfallende Schenkel durch Punkt B - Maß für die zeitlichen S-Phasenunterschiede - nimmt auch die Schwankungen der G_2-Phase - dargestellt in der Schenkelsteigung durch Punkt A - in sich auf.

Auch die Höhe des Plateaus, beziehungsweise überhaupt schon eine derartige Ausbildung des Maximums, und die Tiefe des anschließenden Minimums geben Aufschluß über die biologische Varianz im Zyklus. Sie ist deshalb umso geringer, je näher das Maximum über $\overline{AB}$ dem 100%-Plateau ist und je mehr das Minimum zwischen B und C gegen 0% strebt.

Die Punkte A, B, C im 50%-Niveau geben daher am getreuesten die Meßpunkte für die durchschnittlichen Phasenzeiten wieder (Steel et al. 1971; Steel 1972). Die Bestimmung der Zeiten erfolgt durch diese Punkte, wobei A zur Zeit t_A, B bei t_B, C bei t_C nach ^{3}H-TdR-Injektion liegen sollen. t_O sei die Dauer des Null %-Niveaus zu Beginn der Kurve.

Generationszeit	$t_G = t_C - t_A$
S-Phasendauer	$t_S = t_B - t_A$
G_1-Phasendauer	$t_{G1} = t_C - t_B - t_M - t_{G2}$
G_2-Phasendauer	$t_{G2} = t_O$
Mitosedauer (nach Lesher)	$t_M = 2 (t_A - t_O)$

2.3.
Die Zellkinetik im Duodenum

Die Schleimhaut des Duodenums bildet Krypten und Zotten, die von einreihigem, hochprismatischem Epithel mit basalständigen Kernen bekleidet werden. Die Differenzierung dieser Zellen wird kenntlich durch die Ausbildung der sogenannten Mikrovilli. Nur Zellen auf den Zotten und im oberen Teil der Krypte besitzen diesen Saum, d.h. nur hier sind differenzierte Enterocyten zu finden.

Den Ursprungsort dieser Zellen sah schon 1892 Bizzozzero in den Krypten, da er nur hier Zellen in Teilung beobachten konnte. Über ^{32}P markierte Zellen wurde erstmals 1948 die Wanderung der Enterocyten nach ihrer Teilung aus den Krypten auf die Zotten, bis zum Ort des Zelltods an der Zottenspitze und dem Verlust in das Darmlumen verfolgt (Leblond et al. 1948; Leblond et al. 1956; Messier et al. 1960). 1959 erfaßte Quastler die Vorgänge in der Krypte kinetisch; am Dünndarmmodell demonstrierte er auch erstmals seine "markierte Mitose"-Methode zur Untersuchung des Zellzyklus und seiner Phasen. Viele nachfolgende Publikationen zeigten am Dünndarm insgesamt geringe zeitliche Schwankungen im Zyklus, was sowohl für das Dünndarmmodell als Untersuchungsobjekt als auch für die gute Reproduzierbarkeit der Methode von Quastler spricht.

Zusammenfassend läßt sich aus publizierten Untersuchungen über die Zellpopulation in den Krypten sagen :

1. Eine Population von nicht differenzierten und gleichzeitig nicht proliferierenden Zellen, sogenannte G_0-Zellen, wurde nicht gefunden. Experimente mit Dauermarkierung zeigten, daß alle Zellen innerhalb gewisser Zeit Markierung annehmen (Lesher et al. 1969).
2. Hauptproliferationsort ist das Mittelstück der Krypte (Cairnie et al. 1965).
3. Die Differenzierungszone liegt im oberen Kryptendrittel (Quastler et al. 1959; Cairnie et al. 1965; Hagemann et al. 1970).
4. Jeweils mehrere Krypten liefern an eine Zotte Enterocyten (Hagemann et al. 1970).
5. Vom Zeitpunkt der Entstehung durch Mitose bis zum Tod der Zelle vergehen im Mittel nicht mehr als 48 Stunden (Lesher et al. 1961 c ; Oehlert u. Mitarb. 1961; Hagemann et al. 1970).
6. Davon nimmt mit 10 bis 15 Stunden der Zellzyklus einen großen Teil in Anspruch (Quastler et al. 1959; Lesher et al. 1961 a ; Lesher et al. 1961 b ; Lesher et al. 1961 c ; Koburg u. Mitarb. 1961; Edwards et al. 1961; Koburg u. Mitarb. 1962; Pilgrim u. Mitarb. 1962; Fry et al. 1963; Lesher et al. 1964; Maurer u. Mitarb. 1965; Hagemann et al. 1970).
7. Der Zyklus selbst wird ohne größere biologische Schwankungen in der zeitlichen Dauer der Phasen G_1, S, G_2, M durchlaufen, und jede Zelle in der Proliferationszone befindet sich in einer dieser vier Phasen (Koburg u. Mitarb. 1962; Pilgrim u. Mitarb. 1965).

3.
Material und Methoden

In den vorliegenden Versuch wurden 80 erwachsene, weibliche Mäuse vom Inzuchtstamm NMRI des Zentralinstituts für Labortiere, Hannover, Gewicht 28 - 31 g, einbezogen. Sie wurden gehalten in 20 Gruppen zu je 4 Tieren bei Altromin-Standard-Diät und H_2O ad libitum, bei gleichbleibender Raumtemperatur (25° C) und künstlichem Tag- Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden wechselnd 6 Uhr.

Von jeder Gruppe bekamen je 2 Tiere Bleomycin^R in der Dosierung 20 mg/kg Körpergewicht subcutan in die rechte hintere Schenkelfalte injiziert, 4 Stunden später alle Tiere jeder Versuchsgruppe intraperitoneal 50 µCi Tritium-Methyl-Thymidin (spez. Aktivität 1,6 Ci/mMol, bezogen vom Radiochemical Centre Amersham, England). Gruppenweise wurden die Tiere durch Entbluten in Thiogenalnarkose getötet und zwar nach 30, 60, 90 Minuten bzw. 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 48 Stunden nach der ^{3}H-TdR-Injektion. Der Darmtrakt wurde entnommen, an den Enden unterbunden und mit ca. 5 ml gepuffertem Formalin gebläht, um optimale Präparate zu erhalten.

Nach Fixierung der Organe wurde vom Darm postpylorisch ein 2 cm langes Manschettenstück entnommen und als Duodenum histologisch über eine Entwässerungsreihe aufbereitet, in Parablast eingebettet und mit dem Serienmikrotom 3 - 5 µ starke Schnitte gewonnen. Nach einer Entparaffinierungsreihe wurden die Präparate für die Autoradiographie mit einer photoempfindlichen Schicht versehen. Es wurde die "Dipping"-Methode angewendet und als Emulsion Ilford G-5 gewählt. Anschließend wurden die Präparate in lichtdichten Kästen 4 Tage lang exponiert, mit Kodak-Developer entwickelt und mit Kodak-Unifix fixiert. Alle Präparate wurden daraufhin eine Stunde lang gewässert und mit Mayers Hämalaun gefärbt. Anschließend erfolgte die "Bläuung" in Leitungswasser und nach dem Trocknen das Eindecken der Objektträger.

Auswertung der Präparate :

Es wurden 3 verschiedene Zählungen ausgeführt. In einer ersten Zählung wurden von allen 80 Tieren jeweils 100 Mitose-Zellen in den Duodenalkrypten aufgesucht und ihre Markierung beurteilt. Zellen galten als markiert, sobald mehr als 6 Silberkörnchen über dem Kern sichtbar waren. Es wurden nur Zellen in der Metaphase der Mitose gewertet - diese Untersuchung ist die Grundlage für die "markierte Mitose"-Kurve.

In einer zweiten Zählung wurden von allen 80 Tieren jeweils 20 möglichst ideal längs getroffene Duodenalkrypten ausgewertet. Dabei wurden gezählt :

1. die Gesamtzahl der Zellen in der Krypte und
2. davon die markierten Zellen,
3. die Zellen in der Metaphase der Mitose und
4. davon die markierten Zellen,
5. Zellen mit Kerndefekt und
6. davon die markierten Zellen.

In einer dritten Zählung wurden bei den 40 Tieren der Gruppen zwischen 8 und 20 Stunden nach ^{3}H-TdR-Injektion 50 Duodenalzotten daraufhin durchmustert, ob die Zottenbasis markierte Zellen aufwies. Jede Zottenseite wurde getrennt bewertet; das ergab pro Zotte zwei Werte, pro Tier 100 Werte.

4.
Ergebnisse

4.1.
Auswertung der Zählung von jeweils 100 Mitose-Zellen pro Tier

4.1.1.
"Markierte Mitose"-Kurve der unbehandelten Tiere

Bei allen 40 unbehandelten Tieren wurde pro Krypte etwa 1 Mitosezelle in der Metaphase gefunden. Die graphische Darstellung des Verhältnisses der markierten zur Gesamtzahl der Metaphasezellen kommt dem theoretischen Idealbild der "markierten Mitose"-Kurve nahe : Bildung eines hohen Plateaus zwischen A und B und steile Schenkel, die auf konstante Phasenzeiten hinweisen (Abbildung II).

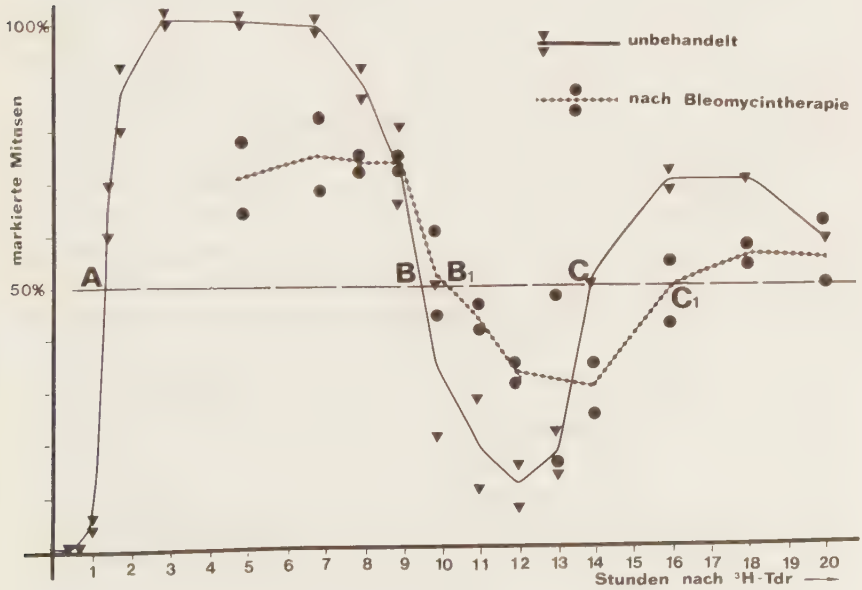

Abb. II :"Markierte Mitose"-Kurven
Die Einzelwerte repräsentieren den Anteil der ^{3}H-TdR-markierten Mitosen von 100 Mitosen jeweils eines Tieres

Die ermittelten Schnittpunkte der Kurve mit der 50%-Achse sind : A bei 1,4 Stunden, B bei 9,5 Stunden, C bei 13,9 Stunden. Aus der Berechnung für die einzelnen Phasen (siehe Abschnitt Grundlagen) ergeben sich folgende Werte :

t_{G1} = 2,6 Stunden

t_S = 8,1 Stunden

t_{G2} = 1 Stunde

t_M = 0,8 Stunden

Die Generationszeit $t_G = t_{G1} + t_S + t_{G2} + t_M$ = 12,5 Stunden

4.1.2.
"Markierte Mitose"-Kurve der mit Bleomycin^R behandelten Tiere

Obwohl zwischen Bleomycin^R-Injektion und ^{3}H-TdR-Angebot bereits 4 Stunden verstrichen sind, findet man noch weitere 3 - 5 Stunden keine Mitosezellen in den Krypten (Abbildung II). Bei 5 Stunden wurden die ersten Mitosen gesehen, weit weniger als bei den unbehandelten Tieren. Das Verhältnis der markierten zur Gesamtzahl der Mitosen zeigt graphisch weder den theoretischen noch den experimentell zu erwartenden Verlauf. Die Punkte B_1 und C_1 sind abgrenzbar, die Kurve erreicht jedoch kein 100%-Plateau und sinkt anschließend wenig unter 50%. Punkt A_1 kann wegen fehlender Mitosen für die ersten 5 Stunden nach ^{3}H-TdR nicht dargestellt werden. Aus dem gleichen Grund fehlt ein Null%-Niveau. Theoretisch muß A_1 zwischen 3 und 5 Stunden liegen, die Generationszeit $\overline{A_1C_1}$ der Zellen nach Bleomycin^R-Behandlung liegt demnach zwischen 11 und 13 Stunden. Wichtig ist das Nichterreichen des 100%-Plateaus; da keine G_0-Population für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden kann, müssen zusätzliche Mechanismen den Verlauf der Kurve bestimmen.

Die Generationszeit ist

$$t_{\gamma} = t_{G1} + t_S + t_{G2} + t_M = 12 \pm 1 \text{ Stunden}$$

Ursache für den atypischen Verlauf der "markierten Mitose"-Kurve (vergleiche Abbildung I) ist im vorliegenden Versuch ein prämitotischer Block im Ablauf des Zellzyklus nach Bleomycin^R-Therapie : Die Kurve beginnt erst 5 Stunden nach ^{3}H-TdR-Gabe und gibt deshalb nach der üblichen Methode keine exakten Werte für die Phasenzeiten an. Angenäherte Werte kann man berechnen, wenn der restliche darstellbare Kurvenverlauf nach dem Modell der "markierten Mitose"-Kurve regelrecht verläuft. Für einen solchen regelrechten Verlauf fordert Quastler die Anwendung der Methode nur bei asynchronen Zellpopulationen, die sich im "steady state" befinden. Steel (1971, 1972) bezieht sich darauf und stellt für die Anwendung der Methode im einzelnen folgende Bedingungen :

a) Homogenität der Zellpopulation -
Diese ist im vorliegenden Experiment mit der Kryptenpopulation des Duodenums der Maus sicher gegeben.

b) Asynchronität der Zellteilung -
Das Maß der Synchronität ist der Mitoseindex und sein Verlauf über eine Zeit, die der Generationszeit entspricht. In der vorliegenden Untersuchung konnte ein prämitotischer Block mit nachfolgendem langsamen Anstieg der Mitosehäufigkeit bis über die Norm nachgewiesen werden, d.h. eine partielle Synchronisation scheint durch den Zyklusblock zu erfolgen.

c) Konstanz der Generationszeit -
Diese Forderung wird in der vorliegenden Untersuchung nicht sicher erfüllt, da vor allem die prämitotische Ruhephase G_2 variabel zu sein scheint, und bei sonst gleichbleibenden Phasenlängen damit auch die Generationszeit variieren würde.

d) Der Kernzyklus darf nicht durch die radioaktive Substanz beeinflußt werden, insbesondere dürfen markierte Zellen nicht durch Zelltod aus dem Zyklus gehen -
In der vorliegenden Untersuchung wurde eine übliche Do-

sierung von 50 µCi ^{3}H-TdR pro Tier entsprechend 1,5 µCi pro Gramm Körpergewicht angewendet. Im Kontrollkollektiv mit der gleichen Dosierung findet sich kein Hinweis für eine Zellschädigung. Im Gegensatz dazu konnten bei den mit Bleomycin^{R} behandelten Versuchsgruppen Zellen in Karyolyse nachgewiesen werden - Zellen, die zuvor noch Tritium inkorporiert haben (siehe 4.2.2.3.).

e) Sofortige Markierung von S-Phasen-Kernen -
Im Experiment ist eine Verzögerung nicht erkennbar, denkbar allerdings ist eine spätere Wiederverwertung von markierten Thymin-Derivaten über den "salvage pathway"-Mechanismus, was bei der beobachteten häufigen Karyolyse auch zu erwarten ist.

f) Gleiche statistische Verteilung der Phasendauer bei allen Phasen -
Die Verteilungskurven der einzelnen Phasenlängen sind im vorliegenden Experiment sicher verschieden von dem Bild der Kurve für die G_2-Phasen. Hier reicht die biologische "Schwankung" vom totalen Block in G_2 bis zu einer G_2-Dauer ähnlich der des Kontrollkollektivs.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach einmaliger Bleomycin^{R}-Verabreichung die Zellkinetik der Kryptenepithelzelle sich aus dem "steady state" wegentwickelt hat, und die Methode der "markierten Mitose"-Kurve deshalb zu eingeschränkten Aussagen führen muß. Immerhin läßt sich eine nur mit dieser Methode machbare Aussage über die Generationszeit der Enterocyten machen : Wie das Aufeinanderfolgen der Kurvenmaxima erkennen läßt, hat sich die Generationszeit im Mittel kaum verändert. Diese Aussage ist aus folgendem Grund möglich : Das 2. Kurvenmaximum wird von der Töchtergeneration der Zellen dargestellt, die das 1. Maximum bildeten. Zwischen den Maxima muß infolgedessen die Generationszeit liegen.

Der Zellzyklusblock in der G_2-Phase erklärt, daß die experimentell erhaltene Mitosekurve nicht das 100 %-Plateau erreicht, nicht vom 0 %-Niveau aus steigen muß, und daß bei der Bewertung der S-Phase die Distanz zwischen A_1 und B_1

nicht die wahre Synthesedauer darstellt (vergleiche Abbildungen I und II). In unserer Versuchsanordnung bedeutet ein sofortiger Block in G_2, daß zum Zeitpunkt der ^{3}H-TdR-Injektion bereits Zellen der frühen S-Phase fehlen; lediglich Zellen in fortgeschrittener S-Phase inkorporieren ^{3}H-TdR und gehen in die G_2-Phase, wo sie geblockt werden, wie das Fehlen von Mitosefiguren beweist. Nach einer gewissen Zeit gelangen diese Zellen dann doch noch in das Mitosestadium : Die graphische Darstellung zeigt einen ansteigenden Verlauf, wenn die ersten Zellen (= zum Zeitpunkt der ^{3}H-TdR-Injektion Zellen der s p ä t e n S-Phase) jetzt als markierte Mitosen erscheinen. Die "markierte Mitose"-Kurve wird wieder fallen, wenn die Zellen der m i t t l e r e n S-Phase als Mitosen zu sehen waren. Die Kurve würde also noch später fallen, wenn zum Zeitpunkt "Null" der ^{3}H-TdR-Injektion noch Zellen der frühen S-Phase im Zyklus gestanden hätten. Unsere Kurve erscheint durch den Zyklusblock in G_2 also "künstlich" verkürzt und damit auch der Wert für die S-Phasenlänge (siehe Abbildung II).

Es wird berichtet, daß die Dauer der Zyklusblockade dosisabhängig sein soll (Barranco et al. 1971; Cohen et al. 1972; Schumann 1973). Für das vorliegende Experiment könnte das bedeuten, da Bleomycin^R rasch ausgeschieden werden soll, daß Zellen, die zum Zeitpunkt der Bleomycin^R-Gabe gerade in die G_2-Phase gelangen, länger arretiert werden als Zellen, die einige Stunden später in diese Phase kommen. Dieser Effekt erklärt den Verlauf der "markierten Mitose"-Kurve (Abbildung II) :

a) Zellen der frühen S-Phase gehen nach Blockende relativ früher in Mitose als die der späten S-Phase. In der Graphik erscheint die S-Phase (A_1B_1) wiederum verkürzt.
b) Markierte und nicht markierte Zellen verlassen nach verschieden langem Aufenthalt in G_2 die Ruhephase und teilen sich. Die Folge ist, daß keine 100 %-Markierung und kein Plateau erreicht wird. Vor allem aber kann sich kein Null %-Niveau als Beginn der Kurve einstellen.
c) Mitosen können gehäuft auftreten (die Zellen sind partiell synchron).

4.2.
Auswertung der Zählung von jeweils 20 Duodenalkrypten

4.2.1.
Unbehandelte Tiere

4.2.1.1.
Mitoserate

Pro Krypte wurde im Mittel 1 Mitosezelle gefunden. Da die Streuung der Werte innerhalb der unbehandelten Tiere nicht unerheblich war, wurden noch Untersuchungen darüber angestellt, inwieweit tageszeitabhängige Biorhythmik hierbei eine Rolle spielt. Nach früheren Untersuchungen wurden solche tageszeitabhängigen Schwankungen des Mitoseindex bei vielen Wechselgeweben gefunden, nicht aber in der proliferativen Zone des Duodenums (Pilgrim et al. 1963). Eine Zusammenstellung unserer Mitosewerte gab keine Abhängigkeit von der Tötungszeit bei den nicht behandelten Tieren (Zeiten zwischen 8 Uhr morgens und 2 Uhr nachts). Im Mittel lag der Mitoseindex der 40 unbehandelten Tiere bei 3,4 %. (Abbildung III)

4.2.1.2.
DNS-Synthese

Bei der Auszählung der markierten Zellen aus 20 Krypten pro Tier erreichten die Kontrolltiere einen durchschnittlichen Wert von 45 % Markierung aller Zellen.

4.2.1.3.
Morphologie

In diesem Kollektiv der unbehandelten Tiere wurden keine Zellen mit Karyorhexis, Pyknose oder Karyolyse gesehen.

4.2.2.
Mit Bleomycin^{R} therapierte Tiere

4.2.2.1.
Mitoserate

Keine einzige Mitose konnte in den ersten 3 Stunden nach ^{3}H-TdR-Gabe beobachtet werden. Es dauerte weitere 7 Stunden bis die Werte des Kontrollkollektivs erreicht und dann sogar noch übertroffen wurden (Abbildung III). 20 Stunden nach ^{3}H-TdR hat der Mitoseindex wieder den Mittelwert der unbehandelten Tiere.

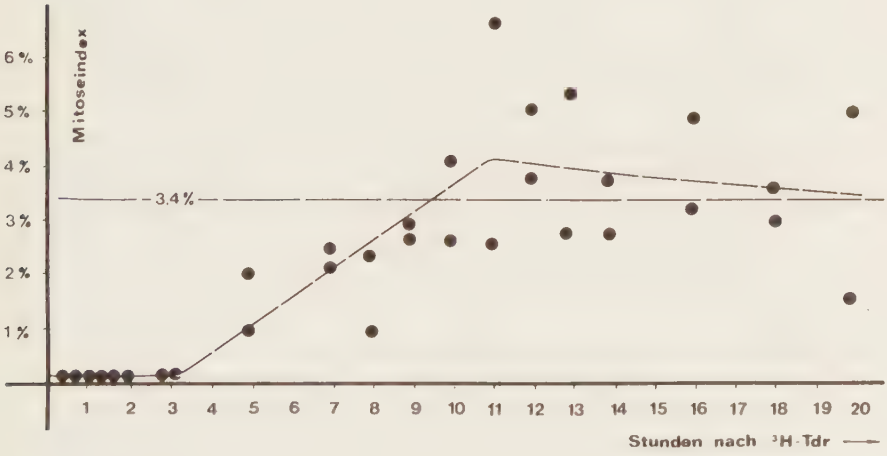

Abb. III : Mitoseindex nach Bleomycin^{R}-Therapie
Die Einzelwerte stellen den Anteil der Mitosen pro 100 Kryptenzellen dar.

4.2.2.2.
DNS-Synthese

Neben dem kompletten Ausbleiben von Mitosen konnte gegenüber dem Kontrollkollektiv lediglich eine Verminderung des ^{3}H-TdR-Einbaus - durchschnittlich 35 % Markierung - gesehen werden. Eine Blockade des Zellzyklus n a c h der nachgewiesenermaßen möglichen DNS-Synthese und v o r dem Eintritt der Zelle in die Mitose, d.h. ein Stop des Zellzyklus in der G_2-Phase, ist also Folge der Bleomycin^{R}-Therapie.

Bei vollständigem Block fehlen zur Stunde "Null" unseres Versuchs bereits 1,4 Stunden lang Zellen, die in die S-Phase gehen sollten (Differenz aus 4 Stunden Blockdauer und 2,6 Stunden G_1-Phasendauer ergibt 1,4 Stunden). In der S-Phase stehen demnach statt $\frac{8,1 \times 100}{12,5}$ % jetzt $\frac{(8,1 - 1,4) \times 100}{12,5}$ % aller Zellen.

Das bedeutet eine Markierungsminderung auf 82,7 % des Wertes der Kontrolltiere und kann in unserem Versuch die geringere Anzahl markierter Zellen erklären.

4.2.2.3.
Morphologie

Der Block ist nicht der einzige Effekt, gleichzeitig werden Zellen in der Proliferationszone geschädigt. 4 Stunden nach Bleomycin^{R}-Injektion sind etwa 7% aller Kryptenzellen in ihrer Morphologie verändert : An Stelle eines Kerns findet man etwa gleich groß im Zytoplasma homogen gelöst erscheinendes Chromatin, stark basophile runde "Tropfen", fast immer von einem optisch leeren Saum umgeben (Abbildungen VI und VII). Die Häufigkeit dieser veränderten Zellen nimmt langsam ab, jedoch sind sie noch 48 Stunden nach ^{3}H-TdR zu sehen. Kernveränderungen dieser Art wurden nur innerhalb der Krypte und im Kryptenlumen, nicht aber auf den Zotten registriert.

ten Kryptenzellpopulation und sinkt innerhalb 10 Stunden auf etwa 3 %; nach 48 Stunden sind allerdings immer noch 2 % defekt.

Die Häufigkeit der Kernveränderungen hängt also mit der Höhe des Bleomycin^{R}-Spiegels zusammen. Offenbar genügen aber nach einmaliger Verabreichung von Bleomycin^{R} noch relativ lange Zeit kleine Mengen dieses Medikamentes, um Zellen in der proliferativen Phase zu zerstören. Daß diese Zellen auch noch zu späteren Zeiten durch Bleomycin^{R} geschädigt werden, konnte durch die Markierung der karyolytischen "Kerne" bewiesen werden und durch den Anstieg der markierten Zellen mit Karyolyse gegenüber der Gesamtzahl der Karyolysen (siehe Abbildung IV). Wenn dabei die Zahl der Karyolysen insgesamt sinkt, kann das nur bedeuten, daß defekte Zellen innerhalb relativ kurzer Zeit eliminiert werden.

Weniger auffällig als in den Krypten sind die Veränderungen bei den Enterocyten auf den Zotten. Auch hier betreffen sie offenbar nur die Kerne : Die Zellen verlieren die beim Kontrollkollektiv übliche Basalständigkeit der Kerne, die wiederum sind polymorph und polychromatisch verändert. Diese Zellen sind auf den Zotten innerhalb der Epithelreihe stets im Verband der markierten Zellen zu sehen, also auch erst etwa 10 Stunden nach ^{3}H-TdR-Injektion. Dies beweist, daß die Zellen ihre Kernveränderung nur erleben, wenn sie als proliferierende Zellen innerhalb ihres Zellzyklus durch Bleomycin^{R} geschädigt werden. Dies zeigt weiterhin, daß funktionelle Enterocyten nicht, wenigstens morphologisch nicht, geschädigt werden.

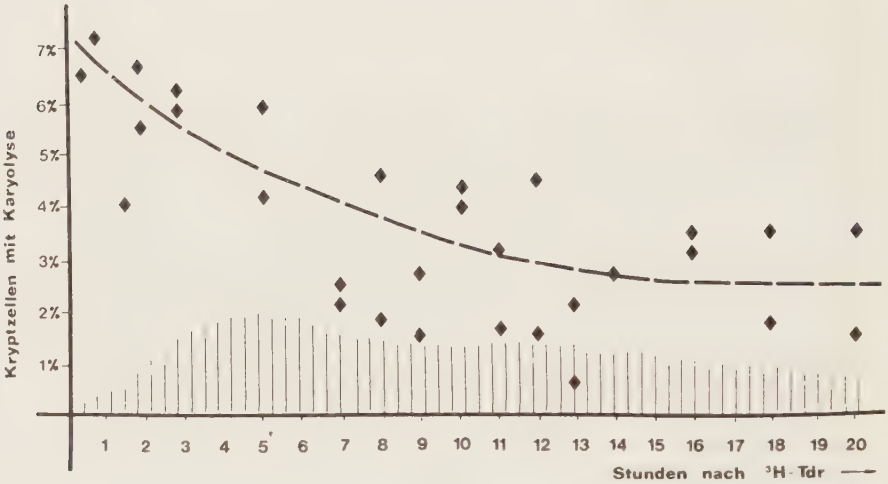

Abb. IV : Zellen mit Karyolyse in % aller Kryptenzellen, davon schraffiert der Anteil der ^{3}H-TdR-markierten Zellen mit Karyolyse.

Bei der Auszählung dieser veränderten Zellen wurde beachtet, ob die Zellen vor ihrer Kernlyse noch DNS synthetisierten und ^{3}H-TdR einbauten; 5 Stunden nach ^{3}H-TdR-Angebot war die Hälfte der geschädigten Zellen markiert, obwohl insgesamt die Zahl der Zellen mit Kerndefekt fallende Tendenz zeigte (siehe Abbildung IV).

Die Markierung zeigt, daß die Zellen nicht zu irgendeinem Punkt X oder gleichzeitig geschädigt werden, sondern mindestens bis 9 Stunden nach Bleomycin^{R}-Gabe nacheinander untergehen, nachdem sie DNS synthetisierten. Der Zeitpunkt im Zellzyklus für die Zyklusblockade einerseits und auch für die Kernschädigung andererseits liegt demzufolge prämitotisch und nach der Synthesephase, also in der G_2-Phase.

Wie aus dem Beobachtungszeitraum des Versuchs über 48 Stunden ersichtlich, beträgt der Anteil der Zellen mit Karyolyse zum Zeitpunkt der ^{3}H-TdR-Injektion etwa 7 % der gesam-

4.3.
Auswertung der Zottenmarkierung

Da der Zeitpunkt der Markierung der Zottenbasis von der Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen abhängt, ist bei gestörtem Nachschub, z.B. durch Zyklusblock, eine verzögerte Markierung der Zotten zu erwarten. 50 % der Zotten sind beim Kontrollkollektiv nach 10,5 Stunden markiert (vergleiche Abbildung V). Nach Bleomycin^{R}-Therapie ist dies erst 3,5 Stunden später der Fall : Der Zellnachschub des Wechselgewebes ist empfindlich gestört. Der 3,5 stündige Verzug gilt allein für den Beobachtungszeitraum n a c h der ^{3}H-TdR-Injektion und erfaßt nicht eine wahrscheinliche Verzögerung in den 4 Stunden zwischen Bleomycin^{R}- und ^{3}H-TdR-Angebot.

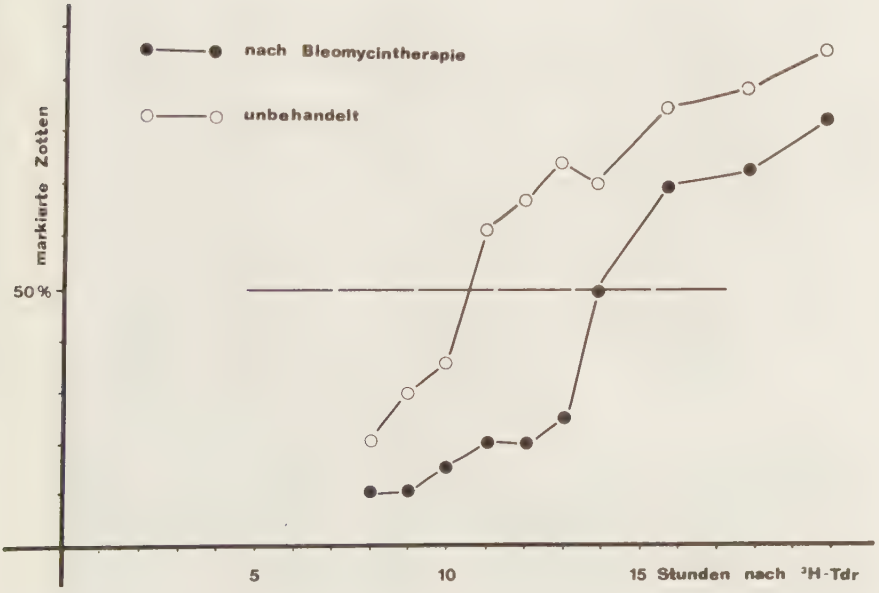

Abb. V : Markierung der Zotten in % aller Darmzotten

Abb. VI : Schnitt durch Duodenalkrypten mit auffällig viel defekten Zellen (4,5 Std. nach Bleomycin^{R}). Keine Mitosen sichtbar, Kerne der Enterocyten zum Teil völlig in Karyolyse.

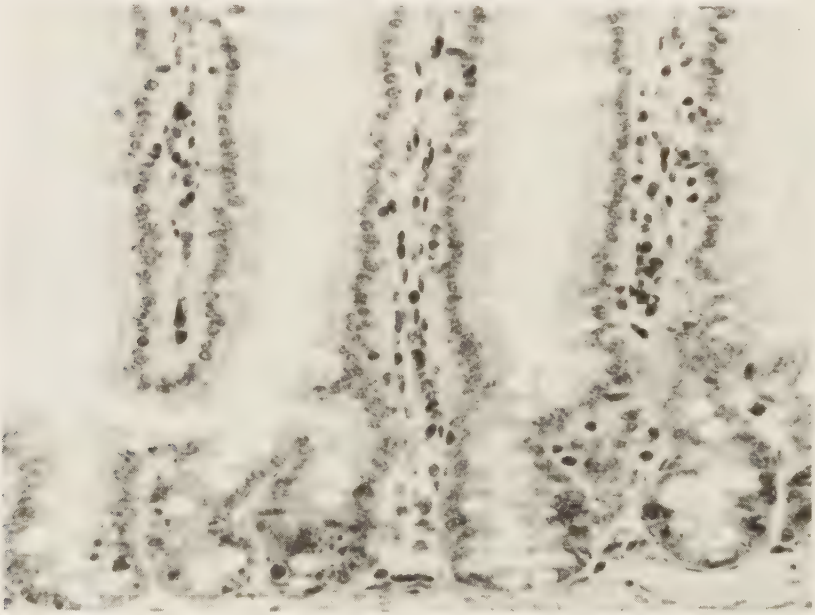

Abb. VII : Schnitt durch Duodenalzotten mit Krypten (4,5 Std. nach Bleomycin^{R}). Karyolyse nur in den Krypten, Zottenepithel regelrecht.

5.
Besprechung der Ergebnisse

5.1.
Zellkinetik nach Bleomycin^R-Therapie

5.1.1.
Wachstumhemmende Wirkung

Bleomycin^R hemmt das Wachstum von gramnegativen, grampositiven und säurefesten Bakterien (Umezawa et al. 1967). In vitro werden E.coli und HeLa-, in vivo auch Ehrlich-Aszites- und Sarkom 180-Zellen gehemmt (Umezawa et al. 1967; Nagatsu et al. 1972). Bei transplantablen Tumoren konnten außerdem das VX-2 Karzinom der Ratte (Nagatsu et al. 1971) und Novikoff-Aszites-Zellen in der Proliferation beeinträchtigt werden (Daskal et al. 1975).

Chemisch induzierte Plattenepitheltumoren der Ratte werden in vivo nach Bleomycin^R-Therapie im Wachstum gehemmt (Bürkle u.Mitarb. 1972, 1973 c).

Chinesische Hamsterzellen, "CHO"-Zellen, in vitro (Mauro et al. 1974) werden gleichermaßen beeinflußt wie Mäuse-L-Zellen (Watanabe et al. 1974) und menschliche T1-Lymphom-Zellen in vitro (Drewinko et al. 1972).

5.1.2.
Zellzyklusspezifische Wirkung

Die proliferationshemmende Wirkung wurde zyklusspezifisch gesehen von Terasima 1970 und 1972, Nagatsu 1971, Barranco 1971, Drewinko 1972, Tobey 1972, und wurde begründet mit dem Nichterreichen der Mitose. Eine Blockierung des Zyklus in G_2 als Ursache dieses prämitotischen Stops diskutierten Barranco 1971, Nagatsu 1971, Tobey 1972, Cohen 1972, Palme 1973, Paika 1973, Krishan 1973, Desai 1974 und Watanabe 1974.

5.1.3.
Phasenspezifische Wirkung

Markierung und Mitosestadium sind Parameter zur Kontrolle des Zellzyklus : Während die DNS-Synthese zeitlich ohne Verzug beginnt, fehlen im vorliegenden Versuch Mitosefiguren bei den Enterocyten.

Bei gleicher Bleomycin^{R}-Dosierung sahen Cohen et al. (1972) einen sofort einsetzenden Block in G_2. In unserem Versuch tauchen erstmals 9 Stunden nach Bleomycin^{R}-Applikation (5 Stunden nach ^{3}H-TdR, siehe Abbildung III) wieder Mitosezellen in den Duodenalkrypten auf. Nach dem langen Zyklusblock übertrifft die Mitosehäufigkeit den Index der Kontrolltiere zum Teil erheblich, die Zellen sind partiell synchron.

Der untypische Verlauf der Mitosekurve nach Bleomycin^{R}-Therapie deutet darauf hin, daß diese Synchronisation durch verschieden lange G_2-Phasen verursacht wird. Ist der prämitotische Block überwunden, läuft der neue Zellzyklus zeitlich wieder wie bei den Enterocyten der unbehandelten Tiere ab.

Das wirksame Prinzip der Bleomycin^{R}-Wirkung scheint also in der Hemmung des Zyklusablaufs zu bestehen.

Entweder gibt es keine besonders empfindliche Phase im Zyklusablauf für die Bleomycin^{R}-Wirkung, oder diese Phase liegt kurz vor der Mitose, z.B. in der G_2-Phase. Darauf deutet der sofort einsetzende komplette Mitoseblock nach Therapiebeginn. Würde der Stop z.B. erst 10 Stunden später einsetzen, müßte man als sensiblen Punkt für die Mitosehemmung eine frühere Phase, z.B. die G_1-Phase diskutieren. Der vorliegende Versuch zeigt aber, daß die empfindliche Phase zu einem Zeitpunkt im Zyklusablauf liegt, zu dem die Zellen ihre DNS-Stränge bereits teilungsfertig synthetisiert haben, also in der G_2-Phase.

5.2.
Veränderungen der DNS-Syntheseleistung und des ^{3}H-TdR-Einbaus nach Bleomycin^{R}-Therapie

5.2.1.
In der Literatur erwähnte Veränderungen

Der offenbar bei allen proliferierenden Zellen eintretende Effekt der Zyklusblockade wurde häufig im Verein mit einer DNS-Synthesebeeinflussung gesehen : Nur bei höheren Bleomycin^{R}-Dosierungen soll die Synthese im Sinne einer Hemmung beeinflußt werden (Umezawa 1967; Cohen 1972). Hingegen keine Wirkung beobachteten Tobey (1972) und Nagatsu (1972). Ein erhöhter DNS-Gehalt pro Zelle wurde berichtet von Nagatsu (1971), Desai (1974) und Mauro (1974), gemessen mit verschiedenen Methoden an verschiedenen Objekten.

5.2.2.
Minderung des ^{3}H-TdR-Einbaus

Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde nach einmaliger, hochdosierter Bleomycin^{R}-Therapie ein Einfluß auf den ^{3}H-TdR-Einbau gesehen : Insgesamt wurden weniger markierte Zellen in den Duodenalkrypten gefunden als beim Kontrollkollektiv. Eine DNS-Synthese ist demnach möglich. Daß im Vordergrund andere Bleomycin^{R}-Wirkungen stehen, wird im Schrifttum berichtet (Barranco et al. 1971; Cohen et al. 1972; Tobey 1972; Schumann 1973; Palme u. Mitarb. 1973).

In einer in vivo Untersuchung am Mäusedünndarm fanden Cohen et al. (1972) v o r einer ^{3}H-TdR-Einbauhemmung bereits eine Mitosehemmung und abgestorbene Zellen; als zytostatische Wirkung der Bleomycin^{R}-Therapie folgern sie primär andere Mechanismen als die DNS-Synthesehemmung.

Im Gegensatz zu echten DNS-Synthesehemmern wie Cytosinarabinosid oder Hydroxyharnstoff, bei denen die Hemmung schlagartig einsetzt, wird ^{3}H-TdR nach Bleomycin^{R}-Verabreichung

kontinuierlich verzögert eingebaut, eine komplette Hemmung wurde noch nie beschrieben.

Da im Zellzyklus ein vollständiger Block nachgewiesen werden konnte, war allein schon von dieser Seite auch eine Beeinflussung des Markierungsindex zu erwarten, und zwar eine Senkung auf 82,7 % der Kontrolle.

Allerdings kann diese rechnerisch erklärbare Indexsenkung nur für den Darm und ähnlich schnell proliferierende Zellsysteme gelten, wenn der prämitotische Block länger als die G_1-Phase dauert - darf dann aber auch nicht vernachlässigt werden.

5.2.3.
Veränderung des ^{3}H-TdR-Index

Eine Erhöhung des Markierungsindex ließe sich über einen Synchronisationseffekt erklären. Da der Index aber eine Verhältniszahl darstellt, sind vielerlei Möglichkeiten zu berücksichtigen.

$$^3\text{H-TdR-Index} = \frac{t_S}{t_G} = \frac{\text{Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen}}{\text{Zahl der Gesamtzellen}}$$

Berücksichtigt man zusätzlich noch eine Zellzyklusblockierung, so sind die Möglichkeiten für eine Erniedrigung des Index noch zahlreicher :

1. t_G verlängert bei gleichbleibender t_S
2. t_G " bei verkürzter t_S
3. t_G " bei gleichbleibender t_S, Block in G_2
4. t_G " bei verlängerter t_S, Block in G_2
5. t_G gleich bei gleichbleibender t_S, Block in G_2
6. t_G " bei verkürzter t_S
7. t_G " bei " t_S, Block in G_2
8. t_G " bei verlängerter t_S, Block lang in G_2
9. t_G verkürzt bei relativ mehr verkürzter t_S
10. t_G " bei verkürzter t_S, Block in G_2

11. t_G verkürzt bei gleichbleibender t_S, Block lang in G_2
12. t_G " bei verlängerter t_S, Block lang in G_2

5.2.4.
Bedingungen für die Interpretation des ^{3}H-TdR-Index

Diese oben genannte Vielzahl von Möglichkeiten ist nur dann zu diskutieren, wenn die Bedingung aufrechterhalten wird, daß ^{3}H-TdR sofort und nur in der S-Phase und vor allem proportional zu den endogen gebildeten, unmarkierten Thymin-Derivaten für die DNS-Synthese verwendet wird. Weitere Voraussetzungen für die Vergleichbarkeit des ^{3}H-TdR-Index sind, daß die untersuchten Zellen in asynchronen Systemen beobachtet werden, daß keine markierten Zellen durch Zelltod verloren gehen, daß sich die Zellkinetik zwar geändert haben darf, diese Veränderung aber zum Zeitpunkt der Markierung nicht mehr im Fluß sein darf. Nichterfüllung dieser Voraussetzungen hätte ^{3}H-TdR-Indices zur Folge, die über die kinetischen Vorgänge in der Zelle quantitativ und qualitativ nur eingeschränkte Aussagen machen können (Kizer et al. 1971; Gurley et al. 1971; Grunicke u. Mitarb. 1973).

5.2.5.
Mögliche Beeinflussung des ^{3}H-TdR-Index durch Bleomycin^R

Obwohl ein direkter Einfluß auf die DNS-Synthesemessung zu erwarten ist, wenn der Zellzyklus prämitotisch lange genug geblockt wird, wurde dieser Mechanismus bisher nicht diskutiert.

Dagegen findet man in der Literatur Hinweise dafür, daß die Vorstufen der DNS-Basen - hier das ^{3}H-TdR - für die DNS-Synthese nicht in gleicher Weise verfügbar sind wie in unbeeinflußten Zellen. Untersuchungen von Cohen et al. (1972)

ergaben, daß in die Kryptenzellen von Mäusen insgesamt weniger ^{3}H-TdR eingebaut war als bei den Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu war der "pool" an Thymidintriphosphat (TTP), dem letzten Thymin-Derivat vor dem Einbau in die DNS, nicht vermindert. Zur Folge hätte dies einen niedrigeren ^{3}H-TdR-Index bei gleichbleibender DNS-Syntheserate.

Sartiano (1975) berichtet über vermehrten ^{3}H-TTP-Einbau in Rattenleber-Zellkerne nach Bleomycin^{R}-Therapie und diskutiert eine Stimulierung der DNS-Polymerase. Auf der anderen Seite beobachten Müller und Mitarbeiter (1976) in vitro eine Hemmung von verschiedenen DNS-Polymerasen, isoliert aus einem Virus und je einem Vertreter der Pro- und Eukaryonten.

Vieles spricht dafür, daß Bleomycin^{R} sich direkt mit DNS-Strängen verbindet, wobei Thymin freigesetzt wird (Müller u. Mitarb. 1976). Es liegt nahe anzunehmen, daß dieses Thymin über den "salvage pathway"-Mechanismus wiederverwendet werden kann. Daß in dieser speziellen Stoffwechselsituation dann exogen angebotenes Thymidin anders verwertet wird als bei nicht beeinflußtem Basenstoffwechsel, muß man diskutieren, insbesondere deswegen, da ^{3}H-Thymidin ebenfalls über den "salvage pathway"-Mechanismus für die DNS-Synthese zum Triphosphat aufgebaut wird.

Es ist wegen aller oben genannten Ergebnisse zu vermuten, daß der Markierungsindex bei Untersuchungen über die DNS-Synthese unter Bleomycin^{R}-Therapie ähnlich denen mit dem Zytostatikum Trenimon (Grunicke 1973) nicht interpretierbare Werte bringt, wenn man mit Interpretation quantitative Aussagen über die DNS-Synthese meint.

5.3.
Beobachtung über Veränderungen der Zellmorphologie

5.3.1.
In der Literatur erwähnte Veränderungen

Neben der Beeinflussung des Zellzyklusablaufs und der DNS-Synthese wird in der Literatur von zellmorphologischen Veränderungen nach Bleomycin^{R}-Therapie berichtet. Bleomycin^{R} bewirkt in vitro und in vivo Chromosomenbrüche (Suzuki et al. 1969). Chromosomendefekte, wie sie nach ionisierender Strahlenbehandlung auftreten können, sahen Omaha et al.(1970) und Bornstein et al. an menschlichen Knochenmarkzellen (1971). Kernpolymorphie, verursacht durch Endoreplikation, beschrieben Bürkle et al.(1973 a), Krishan (1973) und Desai et al. (1974).

Kernveränderungen durch Karyolyse sahen Bürkle et al. (1973 a), Cohen et al. (1972) und Nagatsu et al. (1972). Strukturveränderungen im Zytoplasma wurden von Daskal et al. (1975) berichtet. Daskal et al. (1975) und Krishan (1973) beobachteten morphologische Veränderungen am Nukleolus.

5.3.2.
Veränderungen bei proliferierenden Zellen

Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden wieder pathologisch veränderte Zellen in der Krypte und zu einem viel späteren Zeitpunkt Zellen mit Kernveränderungen innerhalb der Epithelreihe auf den Zotten gesehen. Die Veränderungen betreffen in beiden Fällen den Kern : Bei maximal 7 % aller Enterocyten findet man an Stelle eines Kerns etwa gleich groß, rund, tropfig gelöstes und homogen erscheinendes, stark basophiles Chromatin, meist von einem optisch leeren Spalt umgeben. Karyolysen gleicher Art wurden an Dünndarmzellen nach Bleomycin^{R} von Cohen et al. (1972) und nach Methotrexat^{R} von Eder und Mitarbeitern (1966) und von Trier (1962) beschrieben.

5.3.3.
Veränderungen bei nicht proliferierenden Zellen

Veränderungen bei Zellen außerhalb der Krypten wurden in unserem Versuch registriert : Kernvariationen in Form und Färbbarkeit, insgesamt Verlust der Basalständigkeit der Kerne auf den Zotten. Da diese funktionellen Zellen jedoch mit diesen Veränderungen nur im Verband mit markierten Zellen und etwa 10 Stunden nach Bleomycin^{R}-Therapie gesehen werden konnten, muß der Zeitpunkt der Schädigung im Zellzyklus in der Krypte gelegen sein. Zellen auf den Zotten distal dieser geschädigten Zellen waren stets morphologisch unauffällig.

Die Untersuchung zeigt, daß Bleomycin^{R} die Zellen offenbar nur in der Wachstumsphase beeinflußt, funktionelle Zellen also nicht.

Inwieweit die beschriebenen funktionellen Zellen trotz Schädigung ihre spezifischen Leistungen vollbringen können, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Zellen mit Karyolyse, wie sie innerhalb des proliferierenden Kompartiments in der Krypte und nur hier gesehen wurden, sind sicher irreversibel geschädigt und "tot". Da sie häufig lumenwärts oder auch direkt innerhalb des Kryptenlumens gefunden werden, ist zu vermuten, daß defekte Zellen durch Abstoßen in das Darmlumen bereits in den Krypten eliminiert werden.

5.3.4.
Phasenabhängige Veränderungen

Die Markierung der Zellen mit Karyolyse zeigt weiter, daß die Zellen vor ihrem Untergang noch in der Lage waren, DNS zu synthetisieren. Da aber zum Zeitpunkt "Null" wegen der Zyklusblockade keine Zellen mehr in der G_1-Phase stehen konnten, müssen die Vorgänge, die zur Kernlyse führen, spä-

ter erfolgen. Da andererseits auch noch DNS-Synthese möglich ist, ist denkbar, daß die Kerne in der späteren S-Phase oder in der G_2-Phase durch Karyolyse untergehen.

Zeitpunkt der Zyklusblockade und Zeitpunkt, an welchem die Zellkerne in Lyse gehen, scheinen also übereinzustimmen.

5.4.
Beobachtungen über die Epithelerneuerung im Dünndarm

Die Tatsache, daß die Proliferationszone der Duodenalkrypte nach Bleomycin^R-Therapie keine Mitosen hervorbrachte, und daß darüberhinaus noch Zellen nach Karyolyse in das Darmlumen verloren wurden, ließ eine Verzögerung der Epithelerneuerung der Zotten vermuten.

Nach Altmann et al. (1967) und Hagemann et al. (1970) ist die Zahl der zur Zotte einwandernden Zellen proportional der Mitoseaktivität. Bedingung ist auch hier wieder ein "steady state", welcher im vorliegenden Versuch nicht besteht. Die ermittelte Differenz der Zellwanderung von 3,5 Stunden gibt deshalb auch nur einen Minimalwert für den beobachteten Zeitraum (siehe Abbildung V). Die Differenz muß noch größer sein, da die Zellwanderung erst ab dem Zeitpunkt der ^{3}H-TdR-Injektion erfaßt wird, nicht aber eine Verzögerung in den 4 Stunden zwischen Bleomycin^R-Verabreichung und ^{3}H-TdR-Angebot.

Eine Verzögerung dieser Zellwanderung bedeutet aber eine Schädigung des Zottenepithels, da der physiologische Verlust an funktionellen Zellen nicht ausgeglichen wird. Zottenveränderungen im Sinne einer Zottenverkürzung und -verplumpung sind die möglichen Folgen, wie sie praktisch auch im Tierversuch von Bürkle und Mitarbeitern (1973 a) nach einmaliger Bleomycin^R-Injektion experimentell erzeugt wurden. Die gleiche indirekte zytostatische Wirkung auf den Dünn-

darm wurde auch für Methotrexat^{R} beschrieben (Eder u. Mitarb. 1966).

Für wichtig erachtet werden muß die Feststellung, daß die Mechanismen der Epithelerneuerung bei Mensch und Tier vergleichbar sind und nur zeitlich verschieden ablaufen. Eine beobachtete Schädigung dieses Systems im Tierexperiment läßt also grundsätzlich auch entsprechende Veränderungen unter der klinischen Therapie am menschlichen Darm erwarten.

6.
Ausblick auf Therapiemöglichkeiten

6.1.
Voraussetzungen

Um Nebenwirkungen der Bleomycin^{R}-Therapie zu vermindern oder wenigstens die antineoplastische Wirkung gegenüber dem zytostatischen und toxischen Effekt auf nicht entartetes Gewebe zu steigern, sollte man zunächst zu modifizierten Therapieformen gelangen.

Dabei wäre vor allem zu beachten, daß

a) fraktionierte Applikation einen besseren zytostatischen Effekt hat (Mauro et al. 1974; Terasima et al. 1972),
b) die G_2-Phase besonders für Bleomycin^{R} empfindlich ist (siehe auch Barranco et al. 1971; Paika et al. 1973),
c) der Zellzyklus prämitotisch in G_2 gestoppt wird.

6.2.
Bleomycin^{R} und Strahlentherapie

Eine kombinierte Strahlen-Chemotherapie bietet sich an, da die G_2-Phase wie auch die Mitosephase für Bestrahlung besonders empfindlich ist, und in G_2 die Zellen arretiert werden. Da die Blockierung des Zellzyklus von der Dosishöhe abhängt (Cohen et al. 1972), auf der anderen Seite Bleomycin^{R} aber schnell ausgeschieden wird, sollte man versuchen, einen möglichst geringen, aber für den Zyklusblock ausreichenden Bleomycin^{R}-Spiegel über mehrere Stunden - z.B. mittels Infusionstherapie - aufrecht zu erhalten und direkt anschließend lokal zu bestrahlen. So könnten einerseits empfindliche G_2-Phase-Zellen getroffen werden, andererseits nach Blocklösung teilsynchrone Mitose-Phase-Zellen, die gleich empfindlich sind, geschädigt werden.

6.3.
Optimierte Mono-Therapie

Da Bleomycin^R auf G_2-Phase-Zellen besonders zytotoxisch wirkt, andererseits diese Wirkung dosisabhängig sein soll, könnte man in einem Therapieversuch einer Zyklusblockierung durch geringe Dosen Bleomycin^R einen höheren Bleomycin^R-Stoß folgen lassen.

6.4.
Kombinierte Chemotherapie

Als weitere Therapiemöglichkeit bietet sich eine Kombination von Chemotherapeutika an, wobei Bleomycin^R das zytozide Agens sein könnte und zwar für Zellen, die vorher durch Synchronisation in die G_2-Phase gebracht wurden. Zum Beispiel könnte man mit Hydroxyharnstoff die Zellen an der Stufe G_1/S-Phase blockieren und nach Blockende Bleomycin^R gezielt zur G_2-Phase verabreichen.

Die zytostatische Wirkung Bleomycins^R ermöglicht auch die Umkehrung dieses Modells, insofern als Bleomycin^R durch seinen statischen Effekt Zellen in G_2-Phase arretieren könnte, und eine weitere zytozide Substanz mit G_2-phasenspezifischer Wirkung den "killing"-Effekt ausüben könnte.

6.5.
Zusammenfassende Beurteilung

Bei allen Modellen muß beachtet werden, daß besonders gute Therapieerfolge nach Arretierung oder Synchronisation nur bei neoplastischen Prozessen mit höherer Proliferationsrate zu erwarten sind. Ein weiterer Weg zu günstigeren Therapieergebnissen dürfte sich durch die verschieden hohe An-

reicherung von Bleomycin^{R} besonders in Haut, Lunge und Harnwegen eröffnen (Ichikawa et al. 1967; Umezawa et al. 1968). Mit dem Verständnis der Bleomycin^{R}-Wirkungsweise auf die Zellkinetik und dem daraus für die Therapie folgenden "timing" und Kombinieren von zusätzlichen Methoden könnte man mit diesem neuen Medikament einen Schritt weiter zur spezifischen, antineoplastischen Therapie gelangen.

Bezüglich seiner Wirkung ist Bleomycin^{R} kein neuartiges Medikament, auch ist die Wirkung nicht "spezifisch antineoplastisch". Die Spezifität, die im vorliegenden Experiment belegt wird, betrifft die Wirkung auf den Zellzyklus allein und erklärt sie als zytostatische und zytotoxische. Sie muß deshalb an allen proliferierenden Zellen, die mit Bleomycin^{R} in Kontakt kommen, erwartet werden.

Eine "gewebsspezifische" Wirkung reduziert sich schließlich auf die Tatsache der verschieden hohen Bleomycin^{R}-Konzentrationen in verschiedenen Organen. Die Wirkung ist dabei stets von gleicher Qualität, nämlich zytostatisch und zytotoxisch. In ihrer Quantität ist diese Wirkung aber dosisabhängig und damit in den einzelnen Organen im Ausmaß verschieden. Dies sollte in folgenden Untersuchungen sorgsam beachtet werden, und dies könnte zusammen mit optimierenden Therapiemethoden ein wirklicher Fortschritt für die Krebsbehandlung sein.

7.

Zusammenfassung

Die Kinetik des Zellerneuerungssystems im Duodenum der Maus wurde histoautoradiographisch untersucht und der veränderten Kinetik nach einmaliger Gabe von Bleomycin^{R} gegenübergestellt.

Es konnte beobachtet werden, daß Bleomycin^{R} Zellen in der proliferierenden Phase tangiert; nichts deutete darauf hin, daß auch nicht teilungsaktive Zellen beeinflußt werden.

Die Bleomycin^{R}-Wirkung ist zyklusspezifisch : Die Zellen werden prämitotisch in der G_2-Phase geblockt - über mehrere Stunden sind keine Mitosen zu sehen. DNS-Synthese ist in dieser Zeit möglich, jedoch wurde eine ^{3}H-Thymidin-Einbauminderung gefunden. Die Minderung gegenüber dem Kontrollkollektiv kann durch einen Zyklusblock in G_2 erklärt werden, schließt aber eine zusätzliche Beeinflussung der DNS-Synthese nicht aus.

Der ^{3}H-Thymidin-Einbau als Parameter für die DNS-Synthese nach Beeinflussung der Zelle durch kernaktive Substanzen wurde kritisch beurteilt.

Bleomycin^{R} verändert Zellen auch morphologisch : Ein Teil der proliferierenden Zellen geht durch Karyolyse zugrunde, die Kernveränderung findet in der späten S- bzw. G_2-Phase statt. Auch differenzierte Zellen wurden mit veränderter Morphologie gefunden, jedoch konnte gezeigt werden, daß sie bereits in der Proliferationsphase von Bleomycin^{R} beeinflußt wurden.

Autoradiographisch wurde die Verzögerung des Zellnachschubs für die Zotten erfaßt und mit dem Verlust der Enterocyten durch Karyolyse und dem Fehlen von Mitosen erklärt.

Die vorliegende experimentelle Untersuchung belegt nachdrücklich die "Nebenwirkung" von Bleomycin^{R} auf den Darmtrakt und benützt sie als Modell zum Verständnis einer zytostatischen Wirkungsweise.

Aus Kenntnis dieser Vorgänge der Bleomycin^{R}-Wirkung werden Therapieformen skizziert, die mit diesem neuen Medikament entweder in Monotherapie oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika bzw. Bestrahlung am wirkungsvollsten die phasenspezifische Wirkung ausnützen.

8.
Literaturverzeichnis

Altmann, G.G., Enesco, M. : Cell number as a measure of distribution and renewal of epithelial cells in the small intestine of growing and adult rats. Am. J. Anat. 121 : 319-336 (1967)

Barlow, I.J., Piver, M.S., Chuang, J.F., Cortes, E.P., Ohnuma, T., Hollands, J.F. : Adriamycin and Bleomycin, alone and in combination in gynecologic cancers. Cancer 32 : 735-744 (1973)

Barranco, S.C., Humphrey, R.M. : The effects of Bleomycin on survival and cell progression in Chinese hamster cells in vitro. Cancer Res. 31 : 1218-1223 (1971)

Bizzozzero, G. : Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zum Oberflächenepithel der Schleimhaut. Arch. mikr. Anat. 40 : 325 (1892)

Bornstein, R.S., Hungerford, D.A., Haller, G., Engstrom, P.F., Yarbro, J.W. : Cytogenetic effects of Bleomycin therapy in man. Cancer Res. 31 : 2004-2007 (1971)

Bürkle, G., Bürkle, V., Sander, J. : Bleomycin^{R}-Therapie und kombinierte Bleomycin^{R}-/Strahlentherapie bei Plattenepitheltumoren im Experiment. Congressus Oncologicus et Symposium Tumores Infantum, Karlovy Vary, Cechoslovenia, 20 - 23 Septembris 1972

Bürkle, G., Bühler, B., Dietz, J., Bürkle, V. : Veränderungen der Zellkinetik der Dünndarmschleimhaut durch Bleomycin. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. 360 : 209-222 (1973) a

Bürkle, G., Bürkle, V., Bühler, B., Dietz, J., Sander, J., Kummer, D., Aeikens, B. : Autoradiographische Untersuchungen zur Bleomycin-Wirkung auf verschiedene Wechselgewebe (Epithelien der Haut, der Speiseröhre, der Harnblase und des Dünndarms im Experiment). in : W. Wilmanns: Bleomycin - Experimentelle Grundlagen und erste klinische

Ergebnisse. 1. Deutsches Bleomycin-Symposium in München, Ahnen KG, 7958 Laupheim (1973) b

Bürkle, G. : Autochthone Tiertumoren als Testmodelle für die Chemotherapie mit Bleomycin. In : W. Wilmanns : Bleomycin - Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse. 1. Deutsches Bleomycin-Symposium in München, Ahnen KG, 7958 Laupheim (1973) c

Cairnie, A.B., Lamerton, L.F., Steel, G.G. : Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat.
I. Determination of the kinetic parameters
Exptl. Cell Res. 39 : 528-538 (1965)
II. Theoretical aspects
Exptl. Cell Res. 39 : 539-553 (1965)

Cohen, A.M., Philips, F.S., Sternberg, S.S. : Studies on the cytotoxicity of Bleomycin in the small intestine of the mouse. Cancer Res. 32 : 1293-1300 (1972)

Daskal, Y., Crooke, S.T., Smetana, K., Busch, H. : Ultrastructural study of the effect of Bleomycin A2 on the nucleolus and its possibly related cytoplasmic constituents in Novikoff Hepatoma cells. Cancer Res. 35 : 374-381 (1975)

Desai, L.S., Krishan, A., Foley, G.E. : Effects of Bleomycin on cells in culture: A quantitative cytochemical study. Cancer 34 : 1873-1877 (1974)

Drewinko, B., Novak, J.K., Barranco, S.C. : The response of human lymphoma cells in vitro to Bleomycin and 1,3-bis (2-chloro-ethyl)-nitrosurea. Cancer Res. 32 : 1206-1208 (1972)

Eder, M., Rostock, H., Vogel, G. : Die Wirkung von Folsäureantagonisten (Methotrexat) auf die Regeneration der Darmschleimhaut. Virchows Arch. path. Anat. 341 : 164-176 (1966)

Edwards, J.L., Klein, R.E., : Cell renewal in adult mouse tissue. Am. J. Path. 38 : 437-453 (1961)

Fry, R.J.M., Lesher, S., Kohn, H.J. : Estimation of time of generation of living cells. Nature (London) 191 : 290-291 (1961)

Fry, R.J.M., Lesher, S., Sallese, A., Staffeldt, E. : The generation cycle of duodenal crypt cells of mice exposed to 220 Roentgens of Cobalt-60-gamma irradiation per day. Radiat. Res. 19 : 628-635 (1963)

Ganzer, W., Nitze, H.R., Ritter, R. : Erste Erfahrungen mit dem neuen Cytostatikum Bleomycin. H . N . O . 19 : 115-117 (1971)

Grunicke, H., Hirsch, F., Wolf,H., Bauer,U., Kiefer, G. : Unterschiedliche Beeinflussung des Einbaus radioaktiv markierten Thymidins in die DNA und der DNA-Synthese durch das alkylierende Zytostatikum Trisäthylenimino-benzochinon. in : Aktuelle Probleme der Therapie maligner Tumoren, Thieme Verlag, Stuttgart 220-227 (1973)

Gurley, L.R., Walters, R.A. : Response of histone turnover and phosphorylation to x-irradiation. Biochemistry 10 : 1588-1593 (1971)

Hagemann, R.F., Sigdestad, C.S., Leher,S. : A quantitativ description of the intestinal epithelium of the mouse. Am. J. Anat. 129 : 41-52 (1970)

Ichikawa, T., Matsuda, A., Yamamoto, K., Tsubosaki, M., Kaihara, T., Sakamoto, K.,Umezawa, H. : Biological studies on Bleomycin. A. J. Antibiot. Ser.A 20, 149-155 (1967)

Ichikawa, T., Tsubaki, S., Hirokawa, J. : Stastitical observation of the side effects of Bleomycin. Reference II, 48 : 1-16 (1968)

Ichikawa, T., Nakano, I., Hirokawa, I. : Bleomycin treatment of the tumors of penis and scrotum. J. Urol. 102 : 699-707 (1969) a

Ichikawa, T. : Bleomycin, a new antitumor antibiotic - as a specific agent against the squamous cell carcinoma. J. Jap. Med. Ass. 61 : 487-497 (1969) b

Ishii, Y., Shinozaki, H., Tanaka, T., Kijima, K., Miyamoto, K., Matsuda, A. : Acute toxicity of Bleomycin. Druckschrift der Fa. Nippon Kayaku Co., Ltd., Tokyo (1968)

Kizer, D.E., Howell, B.A. : On relationships between synthesis of DNA and incorporation of deoxythymidine into DNA during myocardial infractions induced in rats by isoproterenol. Chem.-Biol. Interactions 251-264 (1971/72)

Koburg, E., Schultze, B. : Autoradiographische Untersuchungen mit H3-Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese, der Ruhephase und der Mitose bei proliferierenden Systemen wie Epithelien des Darmes, des Oesophagus und der Cornea der Maus. Verh. dtsch. Ges. Path. 45 : 103-107 (1961)

Koburg, E., Maurer, W. : Autoradiographische Untersuchungen mit H3-Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus. Biochim. Biophys. Acta 61 : 229-242 (1962)

Krishan, A. : Bleomycin-induced fine structural alterations in cultured mouse fibroblasts and human lymphocytes of neoplastic origin. Cancer Res. 33 : 777-785 (1973)

Leblond, C.P., Walker, B.E. : Renewal of cell populations. Physiol. Rev. 36 : 255-276 (1956)

Leblond, C.P., Stevens, C.E. : The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. Anat. Rec. 100 : 357-378 (1948)

Lesher, S.W., Baumann, J. : Cell proliferation in the intestinal epithelium. Recent results in cancer research : Normal and malignant cell growth 17 : 49-56 Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)

Lesher, S., Fry, R.J.M., Kohn, H.J. : Age and the generation time of the mouse duodenal epithelial cell. Exptl. Cell Res. 24 : 334-343 (1961) a

Lesher, S., Fry, R.J.M., Sacher, G.A. : Effects of chronic gamma irradiation on the generation cycle of the mouse duodenum. Exptl. Cell Res. 25 : 398-404 (1961) b

Lesher, S., Fry, R.J.M. : Influence of age on transit time of cells of mouse intestinal epithelium : I.Duodenum Lab. Invest. 10 : 291-300 (1961) c

Lesher, S., Walburg, H.E., Sacher, G.A. : Generation cycle in the duodenal crypt cells of germ-free and conventional mice. Nature 202 : 884-886 (1964)

Matsuda, A., Miyamoto, K., Tsubosaki, M., Ishibashi, H., Ota, K., Shimada, M., Ito, K., Yoshioka, O., Yamaguchi, Y., Sakamoto, K., Tanaka, T. : Subacute and chronic toxicities of Bleomycin. Druckschrift der Fa. Nippon Kayaku Co., Ltd., Tokyo (1968)

Maurer, W., Pilgrim, Ch., Wegener, K. Hollweg, S., Lennartz, K.J. : Messung der Dauer der DNS-Verdoppelung und der Generationszeit bei verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit H3- und C14-Thymidin. Radioaktive Isotope i. Klinik u. Forschg. 6 : 96-107 (1965)

Mauro, F., Falpo, G., Briganti, G., Elle, R., Zupi, G. : Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells. II. Bleomycin and Hydroxyurea J. Natl. Cancer Inst. 52-3 : 705-721 (1974)

Messier, B., Leblond, C.B. : Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injektion of thymidine-H^3 into male rats and mice. Amer. J. Anat. 106 : 247-285 (1960)

Müller, W.E.G., Rohde, H.J., Zahn, R.K. : Effect of Bleomycin on DNA, RNA, Enzymes, Chromatin and on Local Sarcoma. J. Mol. Med. 1 : 173-186 (1976)

Nagatsu, M., Okagaki, T., Richart, R.M., Lambert, A. : Effects of Bleomycin on nuclear DNA in transplantable VX-2 Carcinoma of rabbit. Cancer Res. 31 : 992-996 (1971)

Nagatsu, M., Richart, R.M., Lambert, A. : Effects of Bleomycin on the cell cycle of Ehrlich ascites carcinoma. Cancer Res. 32 : 1966-1970 (1972)

Oehlert, W., Büchner, T.H. : Mechanismus und zeitlicher Ablauf der physiologischen Regeneration im mehrschichtigen Plattenepithel und in der Schleimhaut des Magen-Darmtrakts der weißen Maus. Beitr. path. Anat. 125 : 374-402 (1961)

Ohama, K., Kadotani, T. : Cytologic effects of Bleomycin on cultured human leucocytes. Japan. J. Human. Genet. 14 : 293-297 (1970)

Paika, K.D., Krishan, A. : Bleomycin-induced chromosomal aberrations in cultured mammalian cells. Cancer Res. 33: 961-965 (1973)

Palme, G., Schiller, S., Rossdorf, B. : Der Effekt nichtalkylierender Stoffe auf den nicht proliferierenden Pool von Ehrlich-Karzinomzellen. In : Aktuelle Probleme der Therapie maligner Tumoren, Thieme Verlag, Stuttgart 236-241 (1973)

Pelc, S.R. : Incorporation of tritiated thymidine in various organs of the mouse. Nature (London) 793-795 (1962)

Pelc, S.R., Appleton, T.C. : Distribution of tritiated thymidine in various tissues. Nature (London) 205 : 1287-1289 (1965)

Pfister, R. : Die antibiotische Behandlung maligner epithelialer Tumoren der Haut mit Bleomycin - Erste Erfahrungen. Fortschr. Med. 89 : 583-589 (1971)

Pilgrim, C., Maurer, W. : Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdoppelungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit H3 und C14-Thymidin. Naturwissenschaften 49 : 544-545 (1962)

Pilgrim, C., Maurer, W. : Autoradiographische Untersuchungen über die Konstanz der DNS-Verdoppelungsdauer bei Zellarten von Maus und Ratte nach Doppelmarkierung mit H3- und C14-Thymidin. Exptl. Cell Res. 37 : 183-199 (1965)

Pilgrim, C., Erb, W., Maurer, W. : Diurnal fluctuations in the numbers of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. Nature 199 : 863 (1963)

Quastler, H., Sherman, F.G. : Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exptl. Cell Res. 17 : 420-438 (1959)

Sartiano, G.P., Lynch, W., Boggs, S.S., Neil. G.L. : The Demonstration of Separate DNA Polymerase Activities in Intact Isolated Rat Liver Nuclei by Means of Response to Bleomycin and Arabinosyl Cytosine 5-Triphosphate. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 150 : 718-722 (1975)

Schumann, J. : Die Wirkung von Bleomycin auf die DNS von Tumorzellen in vivo und in vitro. In : Aktuelle Probleme der Therapie maligner Tumoren, Thieme Verlag, Stuttgart 85-91 (1973)

Shastri, S., Slayton, R.E., Wolter, J., Perlia, C.P., Taylor, S.G. : Clinical study with Bleomycin. Cancer 28 : 1142-1146 (1971)

Steel, G.G., Hanes, S. : The technique of labelled mitoses : Analysis by automatic curve fitting. Cell tissue kinetic 4 : 93-105 (1971)

Steel, G.G. : The cell cycle in tumours : An examination of data gained by the technique of labelled mitoses. Cell tissue kinetics 5 : 87-100 (1972)

Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N., Umezawa, H. : On the mechanism of action of Bleomycin : Scission of DNA strands in vitro and in vivo. J. Antibiot. Tokyo, Ser. A 22 : 446-448 (1969)

Suzuki, M., Murai, A., Wanatabe, T., Nunokawa, O. : Treatment of cancer of the female genital organs with a new anti-cancer agent, Bleomycin. Vortr. auf dem 6. World congress of Gynaecology and Obstetrics of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics and the 18th Annual Meeting of the American College of Obstetricians and Gynaecologists, New York (1970)

Takeda, K., Sagawa, Y., Arakawa, T. : Therapeutic effect of Bleomycin for skin tumors. Gann 61 : 207-218 (1970)

Terasima, T., Umezawa, H. : Lethal effects of Bleomycin on cultured mammalian cells. J. Antibiot.(Tokyo) Ser.A 23 : 300-304 (1970)

Terasima, T., Takabe, Y., Katsumata, T., et al. : Effect of Bleomycin on mammalian cell survival. J. Natl. Cancer Inst. 49 : 1093-1100 (1972)

Theissing, G. : Die antibiotische Behandlung von Malignomen. Erste Erfahrungen mit Bleomycin in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Fortschr. Med. 89 : 590-593 (1971)

Tobey, R.A. : Arrest of Chinese hamster cells in G2 following treatment with the antitumor drug Bleomycin. J. Cell. Physiol. 79 : 259-266 (1972)

Tobey, R.A. : A simple, rapid technique for determination of the effects of chemotherapeutic agents on mammalian cell cycle traverse. Cancer Res. 32 : 309-316 (1972)

Trier, J.S. : Morphological alterations by Methotrexat. Gastroenterology 42 : 295-305 (1962)

Umezawa, H., Hamao et al. : Review about Bleomycin. Asian Med. J. 8 : 190-209 (1970)

Umezawa, H., Ishizuka, M., Hori, S., Chimura, H., Takeuchi,T.: The Distribution of 3H-Bleomycin in mouse tissue. J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A 21 : 638-642 (1968)

Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y. : New antibiotics Bleomycin A and B. J. Antibiot. (Tokyo) Ser.A 19 : 200-209 (1966)

Umezawa, H., Ishizuka, M., Maeda, K., Takeuchi, T. : Studies on Bleomycin. Cancer 20 : 891-895 (1967)

Völter, D. : Erste Erfahrungen mit Bleomycin in der Urologie. Fortschr. Med. 80 : 593-594 (1971)

Watanabe, M., Takabe, Y., Katsumata, T., Terasima, T. : Effects of Bleomycin on progression through the cell cycle of mouse L-cells. Cancer Res. 34 : 878-881 (1974)

Lebenslauf

Am 1.4.1947 wurde ich, Gottfried Müller, als Sohn des Betriebsingenieurs Hans Müller und seiner Ehefrau Anna Elisabeth Müller, geb. Lukaszczyk, in Sulzbach-Rosenberg geboren. Nach dem Besuch der katholischen Volksschule in Rosenberg von 1953 bis 1956 und der Volksschule in Etterzhausen 1956 bis 1957 wurde ich im September 1957 in das "Musikgymnasium der Regensburger Domspatzen" in Regensburg aufgenommen. Am 19. Juli 1967 legte ich die Reifeprüfung ab und diente anschließend vom 1.10.1967 bis 31.3.1969 bei der Bundeswehr.

Im Sommersemester 1969 studierte ich ein Semester Physik an der Universität Tübingen. Zu Beginn des Wintersemesters 1969/70 wechselte ich zum Medizinstudium und bestand am 5.10.1970 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 28.3.1972 die ärztliche Vorprüfung. 1974 wurde mit der vorliegenden Untersuchung begonnen. Am 22.12.1975 legte ich das Staatsexamen ab und war anschließend als Medizinalassistent vom 15.1.1976 bis 15.5.1976 an der Medizinischen Universitätsklinik und vom 1.7.1976 bis 28.2.1977 an der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen tätig. Seit 1.4.1977 bin ich an der Tübinger Chirurgischen Universitätsklinik als wissenschaftlicher Assistent beschäftigt.